

На правах рукописи

МАРГУЛИС АННА БОРИСОВНА

**НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АУТОРЕГУЛЯТОРНЫЕ
СОЕДИНЕНИЯ КАК ТРИГГЕРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ
СТРЕССА У БАКТЕРИЙ**

03.00.07 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Казань – 2005

Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор Ильинская Ольга Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
с.н.с. Коксин Владимир Петрович

кандидат биологических наук,
в.н.с. Давыдова Марина Николаевна

Ведущая организация: Удмуртский государственный университет,
г.Ижевск

Защита состоится "8" декабря 2005г. в 13.00 на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина (420008, г.Казань, ул. Кремлевская, д.18., главное здание, ауд. 209)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Казанского государственного университета

Автореферат разослан "__" ноября 2005г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент

А.Н. Аскарова

Актуальность проблемы. Биологически активные вещества эндогенного и экзогенного происхождения, не вовлекаясь непосредственно в основной метаболизм клеток, могут оказывать разнообразное влияние на функции клеток. В области исследований устойчивости микроорганизмов к стрессовым воздействиям в последние годы наблюдается очевидный интерес к изучению формирования клеточного ответа, которое осуществляется с участием внеклеточных метаболитов популяционного и межпопуляционного действия. Спектр ауторегуляторных молекул, сопрягающих изменение условий окружающей среды с внутриклеточными реакциями, служит важным триггерным элементом адаптивных систем микроорганизмов. Стрессовые условия могут приводить к образованию различных диссоциативных форм микроорганизмов и форм с иным метаболическим статусом (в частности, некультивируемых). В настоящее время хорошо известна способность многих патогенных бактерий существовать и размножаться в объектах внешней среды – почвах, водоемах и др. Феномен перехода в некультивируемое состояние привлекает внимание исследователей, поскольку образование таких форм может обеспечивать сохранение патогенных бактерий в межэпидемические и межэпизоотические периоды [Романова, Гинцбург, 1993; Романова, Гинцбург, 1996; Романова с соавт., 2002]. Способность к переходу в некультивируемое состояние к настоящему времени выявлена у многих патогенных бактерий, но механизмы этого процесса остаются неясными. В клинической практике известно, что устойчивые формы возбудителей плохо поддаются выявлению и элиминации, поэтому актуальным представляется создание теоретической базы для управления процессами перехода микроорганизмов, в том числе патогенных и условно-патогенных, в некультивируемое состояние. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, позволят обосновать новые технологические подходы к решению этой проблемы.

Цель и задачи исследований. Целью работы является оценка вовлеченности ауторегуляторов физиологического состояния микроорганизмов в процессы неспецифической регуляции физиологической активности бактерий и установление механизмов действия этих веществ как триггерных молекул в адаптивных реакциях бактерий. В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Охарактеризовать токсические эффекты регуляторов группы алкилрезорцинов и гомосеринлактона при воздействии их на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы.

2. Исследовать возможность повреждения генетического материала клеток про- и эукариот синтетическими аналогами аутоиндукторов

анабиоза бактерий, алкилрезорцинами, и плотностно-зависимым регулятором – гомосеринлактоном.

3. Охарактеризовать процесс индукции гипометаболического состояния различных штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий экзогенными алкилрезорцинами и гомосеринлактоном.

4. Выяснить возможность модификации токсигенных свойств патогенных бактерий, их фагоустойчивости и антигенных детерминант при воздействии гексилрезорцина.

5. На основе полученных данных обосновать предполагаемый механизм действия индукторов гипометаболического состояния бактерий.

Научная новизна. Значение синтетических аналогов регуляторов физиологического состояния микроорганизмов (алкилрезорцинов) и плотностно-зависимого регулятора у бактерий (гомосеринлактона) впервые охарактеризовано с точки зрения медицинской практики. Впервые показана возможность регуляции физиологического и метаболического статуса патогенных и условно-патогенных бактерий с помощью описанных соединений. Впервые установлена возможность взаимоперехода диссоциативных форм бактерий с участием экзогенных микробных ауторегуляторов. Впервые показано изменение вирулентности, фагоустойчивости и способности к размножению (колониеобразованию) различных штаммов грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов в результате стрессовых воздействий под действием алкилрезорцинов и гомосеринлактона. Впервые выявлены генотоксические эффекты исследуемых соединений в серии тест-систем с использованием микроорганизмов: в тесте Эймса, SOS-хромотесте, тесте на прямое повреждение ДНК, а также в тесте на индукцию микроядер в эритроцитах периферической крови мышей. Впервые обнаружена связь между повреждающим действием ауторегуляторов на геном и индукцией морфогенеза. Впервые получены данные, позволяющие оценить участие данных ауторегуляторных молекул как триггерных в системе адаптивных реакций у бактерий.

Практическая значимость. Регулирование перехода микроорганизмов в состояние покоя имеет огромное значение для биотехнологии и медицины. Прикладной аспект этой проблемы связан с потенциальной возможностью управления такими процессами, как образование некультивируемых форм патогенов, устойчивых к различным стрессовым условиям, в том числе к фармакологическому воздействию, и сохранение целевой активности промышленных штаммов микроорганизмов – продуцентов биологически активных веществ. Использование экзогенных алкилрезорцинов возможно в любой области

микробиологической практики, где требуется создание условий для образования устойчивых к внешним воздействиям форм микроорганизмов. Полученные результаты позволят создать более полное представление об универсальном ответе микроорганизмов на стрессовые воздействия и сделать соответствующие выводы о потенциальной возможности направленной регуляции патогенности бактерий.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа в течение 2001-2005гг. проводится в соответствии с планом НИР Казанского государственного университета (№ гос. регистрации 01.2.00.1.15733). Исследования автора по тематике работы были отмечены дипломом Минобразования РФ (2002) и поддержаны грантами НОЦ REC007 (2001-2003), НИОКР АН РТ (2003-2004). Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора. Автоматическую регистрацию ростовых параметров бактерий осуществляли на базе РЦПБ СПИД, эксперименты с животными выполнены в ЛБИ ИОФХ им. А.Е. Арбузова.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на VI международной конференции «Проблемы загрязнения окружающей среды» (Пермь, 2005), XIII международной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение» (Казань, 2005), 79-й Всероссийской студенческой конференции к 1000-летию Казани (2005), конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». (Казань, 2004), на XI Туполевских чтениях (Казань, 2003), международной научной конференции «Новая геометрия природы» (Казань, 2003), IV научно-практической конференции молодых ученых и специалистов РТ (Казань, 2001), 7-9-ых Всероссийских конференциях молодых ученых (Пушино, 2003-2005), II, III конференциях НОЦ REC007 «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2001-2002), 39-ой международной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2001), а также на итоговых конференциях КГУ (2001-2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 научных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 126 страницах машинописного текста, включает 10 таблиц, 16 рисунков. Библиография содержит 196 наименований российских и зарубежных авторов.

Материалы и методы

Регуляторные факторы микроорганизмов

В работе исследовали соединения класса алкилрезорцинов (AR): химические аналоги ауторегуляторных факторов d_1 бактерий – метилрезорцин (Met) (Sigma, М.м. = 124) и гексилрезорцин (Hex) (Sigma, М.м. = 196). Для сравнения токсических и генотоксических эффектов первоначально работали также с коммерческим препаратом резорцином (R) (Sigma). Для установления возможного неспецифического действия ауторегуляторного фактора микромицетов по отношению к бактериям был выбран пара-2-гидроксиэтилфенол (D), идентифицированный как регулятор группы d_1 у дрожжей [Батраков с соавт., 1993]. Также в экспериментах использовали индуктор включения *luxI-luxR*-оперона – гомосеринлактон (HSL) (Aldrich, М.м. = 182), который является зависимым от плотности культуры регулятором физиологического состояния бактерий [Givskov *et al.*, 1998].

Исходный раствор алкилрезорцинов готовили в диметилсульфоксиде (DMSO) в концентрации 10мг на 1мл DMSO, далее работали с концентрациями от 10 до 1000 мкг на 1мл дистиллированной воды. Гомосеринлактон и пара-2-гидроксиэтилфенол изначально растворяли в дистиллированной воде.

Химические методы анализа

Количественное определение алкилрезорцинов. Методика обнаружения алкилрезорцинов [Мулюкин с соавт., 1996; Tluscik *et al.*, 1981] основана на их способности взаимодействовать с диазотиевой солью 1,3 – диметоксибензидина с образованием окрашенных в красный цвет комплексов. В работе применяли коммерческий реактив Fast Blue B salt (FBB) (Sigma).

Микробиологические методы анализа

1. Оценка жизнеспособности бактерий при длительном инкубировании и голодании. Объектом исследования служили грамположительные бактерии: мутантный по спорообразованию штамм *Bacillus subtilis spo0E* (*phe A1, spo0E 11, trp C2*) из коллекции ATCC (IDA) США и штамм *Staphylococcus aureus OK*, клинический изолят из коллекции Медицинской Академии РТ. Суспензию, полученную смывом с L-агара (10^7 кл/мл), инкубировали в стационарных условиях при 30°C в колбах на 100мл, содержащих 30 мл дистиллированной воды с каждым из исследуемых веществ (50 мкг/мл, опытный вариант) и без вещества (контрольный вариант). Каждые 2 недели проводили оценку общего числа клеток (ОЧК) и числа колониеобразующих единиц (КОЕ) с описанием морфологии колоний. Параллельно исследовали инкубируемый материал на наличие спор (для штамма *B. subtilis spo0E*) и некультивируемых клеток

(для штамма *S. aureus* ОК) с использованием модификации теста Kogure [Kogure *et al.*, 1979]. В тесте критерием для определения живых клеток является увеличение их размеров при добавлении питательного субстрата в присутствии налидиксовой кислоты, блокирующей деление. В окрашенных витальными красителями препаратах определяли число увеличенных (живых), мелких неокрашенных (жизнеспособных, но некультивируемых) и мелких окрашенных (мертвых) клеток.

2. Оценка токсических эффектов гексилрезорцина при краткосрочном культивировании бактерий на богатой питательной среде и в условиях голодания. Объектом исследования служили грамположительные (*B. subtilis* SK1) и грамотрицательные (*Salmonella typhimurium* TA100 и *Escherichia coli* K12) бактерии. 18-часовые культуры микроорганизмов выращивали на питательном бульоне Мюллера-Хинтона (10^4 кл/мл). Для определения токсических эффектов гексилрезорцина при культивировании бактерий на богатой питательной среде разведения культур делали в бульоне Мюллера-Хинтона. Для аналогичных исследований при голодовом стрессе разведения культур делали в дистиллированной воде. Замеряли рост на приборе «iEMS-Reader» в программе «Микроб-автомат» в течение 18 часов при 37°C.

3. Изменение вирулентности *S. aureus* под действием теплового шока в присутствии гексилрезорцина. Тепловой шок вызывали выдерживанием 12-часовой культуры *S. aureus* ОК при 45°C либо 60°C в течение 10 мин. Сравнивали последующий рост на свежей жидкой питательной среде при 37°C культуры, обработанной гексилрезорцином в течение 12 ч, культуры с непосредственным добавлением гексилрезорцина перед тепловой обработкой, а также необработанной культуры. Параллельно высевали на агаризованную среду для подсчета КОЕ.

4. Индукция морфогенеза *S. typhimurium* TA100. Индукцию образования R-форм у бактерий вызывали исследуемыми ауторегуляторными факторами. Для подтверждения статуса R-форм *S. typhimurium* TA100 проводили биохимический и серологический анализы культуры с помощью посевов на «пестрый ряд» (лаб. микробиологии РЦПБ СПИД, Казань) и набора антисывороток (СЭС, Казань). Помимо этого, проводили определение динамики роста S- и R-форм *S. typhimurium* TA100 при действии гексилрезорцина и без него на приборе «iEMS-Reader» в программе «Микроб-автомат».

5. Определение изменения устойчивости S- и R-форм *S. typhimurium* TA100 к сальмонеллезному бактериофагу. Оценивали изменение устойчивости полученных морфологических форм по отношению к фагу. Фаг получен из Нижегородского государственного

предприятия по производству бактериальных препаратов, "ИмБио", серия 7, 2004г. Тест базируется на выявлении спектра чувствительности культуры к набору стандартных типовых фагов, проявляющейся в лизисе культуры при соответствии фаговара культуры типовому фагу [Пяткин, Кривошеин, 1981].

6. Регистрация наличия плазмиды у S- и R-форм *S. typhimurium* TA100 при действии гексилрезорцина. Штамм *S. typhimurium* TA100 содержит плазмиду устойчивости к ампициллину *pkm* 101. Спонтанно полученные R-формы штамма, а также S- и R-формы, обработанные гексилрезорцином, подвергались пересевам на богатые питательные среды, содержащие ампициллин, в течение нескольких пассажей. Если способность к росту на среде с антибиотиком сохранялась в течение 5 пассажей, то считали, что переход штамма в R-форму, а также обработка гексилрезорцином не приводит к потере плазмиды.

Методы биотестирования

1. Оценка токсического действия исследуемых соединений по отношению к тестерным микроорганизмам. Токсичность препаратов определяли по выживаемости тестерных штаммов для исключения возможности получения ложноотрицательных результатов в испытаниях на мутагенность. В тесте использовали мутантные штаммы *S. typhimurium* из набора для теста Эймса.

2. Тест Эймса на выявление генных мутаций без метаболической активации. Мутагенное действие ауторегуляторов оценивали в тесте Эймса по регистрации частоты реверсий ауксотрофного по гистидину штамма *S. typhimurium* TA 100 к прототрофности. Мутагенную активность учитывали по кратности превышения числа индуцированных ревертантов над спонтанным фоном мутирования [Maron, Ames, 1983].

3. Тест на прямое повреждение бактериальной ДНК. Метод основан на сравнительном анализе выживаемости тестерного штамма бактерий с нормальной активностью репаративных систем и штаммов, дефектных по различным путям репарации в присутствии исследуемого соединения [McCarroll *et al.*, 1981].

4. SOS-хромотест. SOS-хромотест позволяет оценить как ДНК-повреждающую активность вещества, так и вклад ошибочной репарации в общий мутагенез. В работе используют штамм *E. coli* PQ 37 (табл.1) с генотипом – *sfiA::mud* (*Ap lac*) *cts*, *lac A* U169, *mal*⁺, *uvr A*, *gal Y*, *pho C*, *rfa*. В штамме к гену *sfi A*, входящему в число SOS-генов, "подшит" галактозный оперон. При экспрессии этого гена начинает вырабатываться галактозидаза, дающая при расщеплении субстрата (*o* - нитрофенил-β-галактопиранозида) окрашенный продукт [Quillardet *et al.*, 1982].

5. Тест на индукцию микроядер в эритроцитах периферической крови мышей *in vivo*. Суть теста заключается в выявлении и количественной оценке потенциальной цитогенетической активности исследуемого соединения в полихроматофильных эритроцитах периферической крови млекопитающих. Метод основан на микроскопической регистрации клеток с микроядрами. Спонтанная частота таких клеток составляет 0,2-0,3% [Hayashi et al., 1994; Ильинских с соавт., 1991].

Результаты и их обсуждение

Токсические и генотоксические эффекты исследуемых факторов

Показано, что гексилрезорцин обладал выраженным токсическим действием по отношению к *S.typhimurium* в концентрациях 100 мкг/мл и выше. Метилрезорцин проявил токсический эффект только в самой высокой концентрации – 1000 мкг/мл. Резорцин оказался токсичным в двух наиболее высоких концентрациях. Дрожжевой d-фактор (пара-2-гидроксиэтилфенол) и гомосеринлактон не показали токсических эффектов ни в одной из исследуемых концентраций (табл. 1).

Способность исследуемых регуляторов индуцировать генные мутации в клетках бактерий проверяли в тесте Эймса. Как видно из табл. 1, регуляторы, различающиеся по структуре молекул – метилрезорцин, гексилрезорцин, дрожжевой d-фактор, неалкилированный резорцин и гомосеринлактон, обладали разным мутагенным эффектом в диапазоне исследованных концентраций (10 – 1000мкг/мл). Для гексилрезорцина мутагенность удалось зафиксировать только в концентрациях 50 и 100 мкг/мл, так как более высокие концентрации проверять в тесте Эймса было некорректным ввиду высокой токсичности препарата. То же самое можно сказать и о резорцине в концентрации 1000 мкг/мл. У последнего мутагенный эффект был выявлен в концентрациях 100 и 500 мкг/мл. Три других регулятора не показали мутагенного действия ни в одной из исследуемых концентраций (табл. 1).

Показано, что только гексилрезорцин обладал слабо выраженным ДНК-повреждающим эффектом в концентрациях 100 и 50мкг/мл. Для исправления повреждений требуется эксцизионная репарация. Остальные препараты не проявили ДНК-повреждающего действия, что доказано по полному отсутствию зоны лизиса, как на диком, так и на мутантных штаммах *E. coli*.

Таблица 1.

Токсические и мутагенные эффекты исследуемых регуляторов

регулятор	10 мкг/мл	50 мкг/мл	100 мкг/мл	500 мкг/мл	1000 мкг/мл
Hex 1	0	10±2	30±7	90±5	92±5
2	1±0,1	3,5±0,3	5±0,4	НО	НО
Met 1	0	0	3±1	5±1	22±3
2	0,9±0,1	1,2±0,2	1±0,1	1,5±0,3	1,4±0,2
R 1	0	0	12±4	65±6	93±4
2	1,4±0,3	1,8±0,2	4±0,5	7±0,5	НО
D 1	0	0	0	0	0
2	1±0,1	0,8±0,1	1±0,2	1,1±0,1	1,3±0,2
HSL 1	0	0	0	0	3±1
2	1±0,2	1,3±0,2	1,1±0,1	1,4±0,2	1,7±0,2

"1" – Токсичность, % погибших клеток;

"2" – Мутагенность (превышение над контролем, число раз);

"НО" – мутагенность не обнаружена из-за высокой токсичности вещества.

Величины факторов индукции SOS-ответа (IF) для исследованных соединений представлены на рис. 1. Показано, что факторы индукции для метилрезорцина, гомосеринлактона и пара-2-гидроксиэтилфенола в концентрациях от 10 до 100 мкг/мл значительно ниже порогового значения «2», что указывает на отсутствие генотоксических свойств этих препаратов. Для неалкилированного резорцина также не было выявлено индукции SOS-функций, хотя в максимальной из использованных концентраций значение IF достигает порогового уровня (рис. 1).

Для гексилрезорцина были показаны высокие значения IF в концентрациях 100 и 50 мкг/мл, причем даже в концентрации 10 мкг/мл фактор индукции SOS-ответа достигал порогового уровня. Было установлено, что гексилрезорцин в концентрациях 100 и 50 мкг/мл и неалкилированный резорцин в концентрации 100 мкг/мл обладали мутагенным эффектом, регистрируемым по реверсии ауксотрофных по гистидину штаммов *S. typhimurium* к прототрофности, в то время как метилрезорцин не обладал генотоксичностью в этих концентрациях. Таким образом, данные SOS-хроматеста и теста Эймса для этих веществ совпадают, характеризуя гексилрезорцин и резорцин как генотоксичные.

Большинство токсикантов вызывают нарушение генетического материала именно в токсических концентрациях. Истинные генотоксиканты, к каковым можно отнести гексилрезорцин, вызывают мутации в низких концентрациях, не обладающих токсическим действием. Его мутагенный эффект, установленный в тесте Эймса, подтвержден по индукции синтеза ДНК на поврежденной матрице у бактерий (данные SOS-хроматеста) и выявлению прямых повреждений ДНК в штаммах,

дефектных по системам репарации. Именно поэтому гексилрезорцин был выбран для изучения процесса перехода бактерий в гипометаболическое состояние, поскольку возможно, что индукция анабиотического состояния микроорганизмов проходит поэтапно и связана не только с изменением функций ДНК, но и с непосредственной модификацией структуры ДНК.

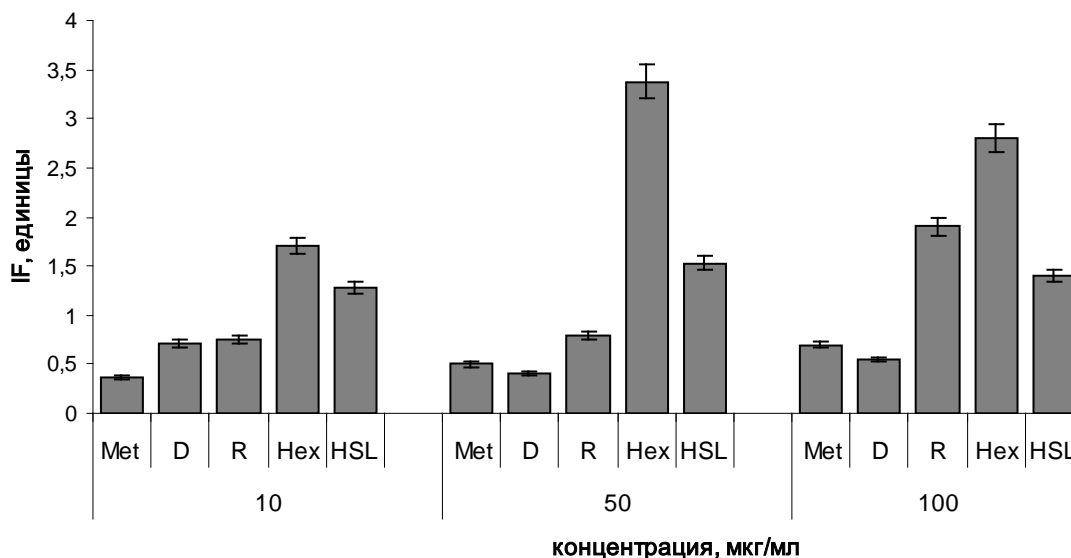


Рис.1. Факторы индукции SOS-ответа при действии различных концентраций регуляторов (Met – метилрезорцин, D – пара-2-гидроксиэтилфенол, R – резорцин, Hex – гексилрезорцин, HSL - гомосеринлактон)

Помимо этого, генотоксические эффекты гексилрезорцина и гомосеринлактона оценивали по превышению числа микроядер в опытном варианте по отношению к контролю в микроядерном тесте. На первые сутки после введения препарата подопытным животным был зарегистрирован мутагенный эффект гексилрезорцина в концентрациях 0,5; 0,05; 0,005 мг/г веса. Превышение числа микроядер по сравнению с контрольным вариантом составило соответственно 6,5; 3,7 и 2,8 раз. На вторые сутки сохранялся высокий мутагенный эффект гексилрезорцина в концентрации 0,5 мг/г веса, что было зарегистрировано по превышению числа микроядер в опыте над контролем в 5,1 раза. В концентрациях же 0,05 и 0,005 мг/г веса генотоксическая активность данного соединения убывала (превышение над контролем соответственно в 2,0 и 2,6 раз). Возможно, это объясняется высокой скоростью метаболизма и обновлением клеток крови мышей. По данным, полученным через 72 часа после введения гексилрезорцина животным, можно говорить о стабильно сохраняющемся мутагенном эффекте исследуемого вещества в концентрации 0,5 мг/г веса (превышение над контролем составило 3,9 раз). В меньших концентрациях генотоксический эффект гексилрезорцина зарегистрирован не был. Гомосеринлактон не индуцировал микроядра в

эритроцитах периферической крови мышей ни в одной из исследуемых концентраций.

Полученные в микроядерном тесте результаты показывают, что гексилрезорцин способен вызывать мутации в геноме не только прокариот, но и эукариот. При этом важно отметить, что метаболическая трансформация гексилрезорцина в организме мышей частично снимает генотоксическое действие вещества.

Изменение физиологической активности бактерий при длительном инкубировании и голодании

Как штамм *S. aureus* ОК, так и дефектный по спорообразованию штамм *B. subtilis spo0E* сохраняли жизнеспособность в течение всего срока инкубации в условиях голодания (28 и 12 недель соответственно) в контрольном варианте и в присутствии регуляторных факторов. Было установлено, что характер динамики числа КОЕ при высеве из суспензий штаммов *B. subtilis spo0E* (рис.2) и *S. aureus* ОК (рис.3), подвергавшихся длительному инкубированию, принципиально различен. Число КОЕ *B. subtilis spo0E* в течение первых 6-и недель резко падало, а затем в течение всего последующего времени инкубации оставалось практически на одном уровне. Вероятно, это связано с поддержанием популяцией роста на лизате погибших клеток. Однако, при сходстве общих тенденций изменения кривых роста *B. subtilis spo0E* в каждом из вариантов, необходимо отметить, что в вариантах с веществами число колоний в каждой временной точке было достоверно меньше, чем в контроле. Наименьшее количество КОЕ регистрировали при высеве бактерий из суспензии с добавлением гомосеринлактона. Также незначительное число КОЕ регистрировали при высеве суспензий с метил- и гексилрезорцином. Кривая роста бактерий в присутствии пара-2-гидроксиэтилфенола имела аналогичный предыдущим кривым характер при несколько большем сохранении числа КОЕ по сравнению с другими опытными вариантами (рис.2). Динамика ОЧК в целом носила характер, аналогичный динамике КОЕ, но значения ОЧК были достоверно выше значений КОЕ в 1,3 – 1,5 раза в каждой временной точке. К 8-ой неделе инкубирования способность бацилл к образованию КОЕ под воздействием исследуемых регуляторов уменьшилась на 1-2 порядка, причем наибольшим эффектом обладал гомосеринлактон. К этому времени в вариантах с гомосеринлактоном и пара-2-гидроксиэтилфенолом были обнаружены споры, то есть, произошла реверсия штамма *spo0E* к исходному спорообразующему генотипу. К 12-ой неделе инкубирования споры появились во всех вариантах, в том числе и контрольном, и составляли до 80% всех клеток в поле зрения микроскопа. Таким образом, установлено, что в присутствии

гомосеринлактона и пара-2-гидроксиэтилфенола реверсия *B. subtilis spo0E* к спорообразующему фенотипу происходит раньше, чем в контроле.

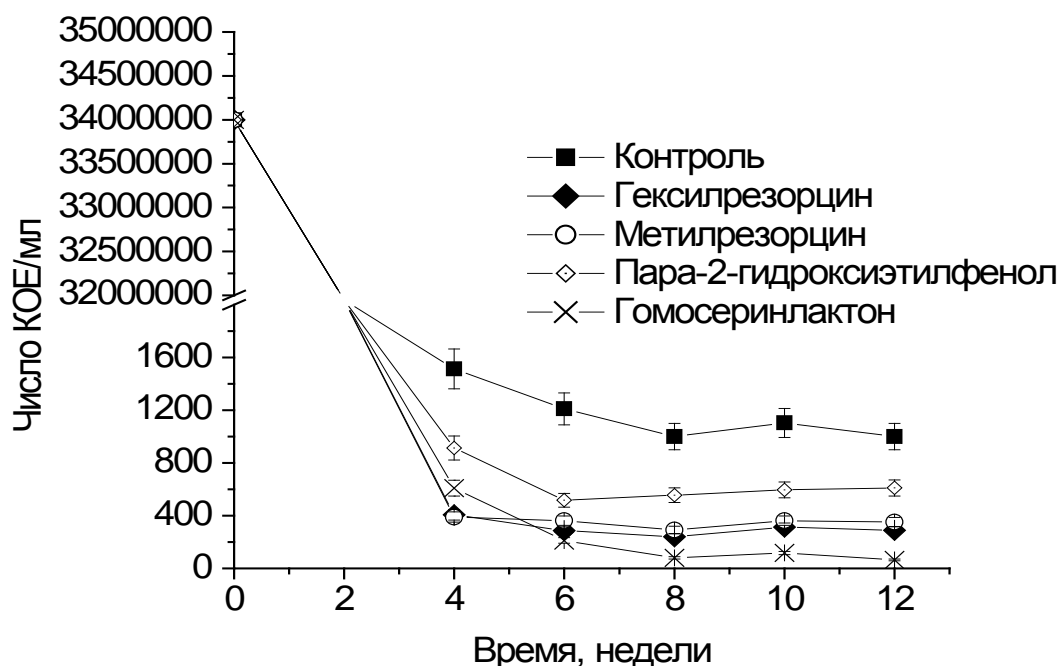


Рис.2. Изменение числа колониеобразующих единиц в процессе инкубирования *B.subtilis spo0E* с добавлением 50 мкг/мл исследуемых веществ – возможных индукторов гипометаболического состояния бактерий – и без их добавления (контроль).

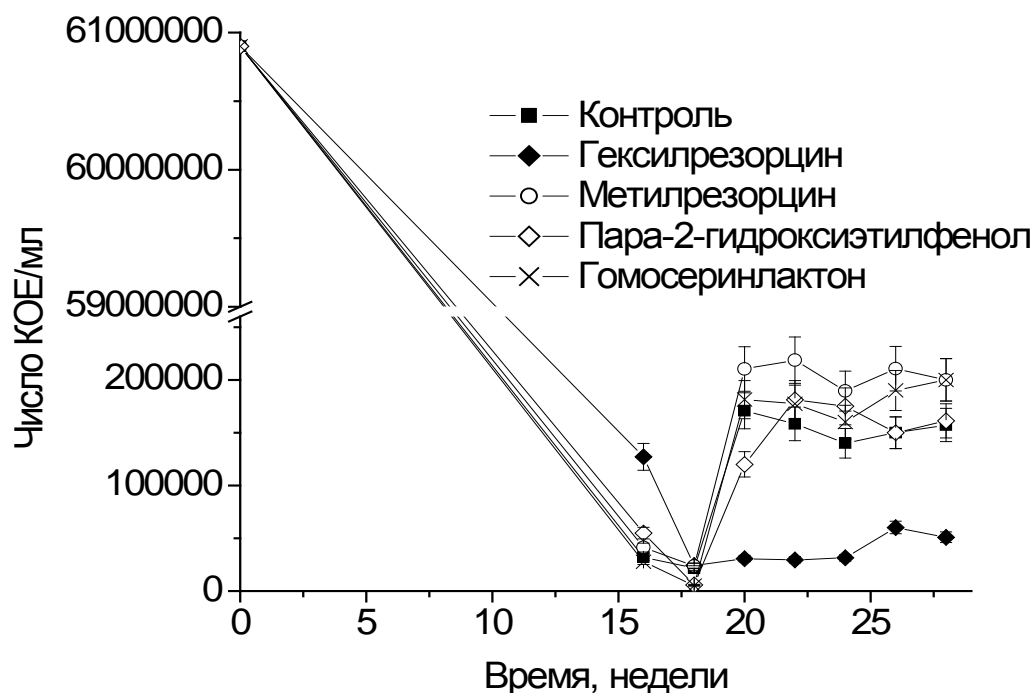


Рис.3. Изменение числа колониеобразующих единиц в процессе инкубирования *S.aureus OK* с добавлением 50 мкг/мл исследуемых веществ – возможных индукторов гипометаболического состояния бактерий – и без их добавления (контроль).

Динамика изменений числа КОЕ для штамма *S. aureus OK* отражена на рис.3. К 18-ой неделе инкубации наблюдали пик снижения числа КОЕ. Продолжение инкубации привело к активации вторичного роста штамма *S.aureus OK* во всех вариантах, кроме варианта с гексилрезорцином, что можно связать с возможной индукцией перехода стафилококков в гипометаболическое состояние под влиянием гексилрезорцина.

Для подтверждения этого предположения был проведен тест *Kogure* [Kogure *et al.*, 1979] с образцом суспензии клеток *S. aureus OK* после 28^н недель инкубации. Около 90% клеток суспензии в варианте с гексилрезорцином не отвечали на внесение экзогенного питательного субстрата, в то время как в контрольном варианте (без гексилрезорцина) таких клеток было обнаружено лишь 27% (табл.2). Клетки, не реагирующие на внесение питательного субстрата, при этом не окрашивались метиленовым синим, что подтверждает их жизнеспособность.

Таблица 2.

Содержание клеток в 28^н-недельной суспензии *S. aureus OK*, отвечающих на внесение экзогенного субстрата (тест *Kogure*), %*

Размер клеток	Без гексилрезорцина	С гексилрезорцином
Активные клетки, %	73±1,3	10±0,7
Гипометаболические клетки, %	27±1,1	90±0,8

*За 100% принято общее число клеток

Из серии исследованных ауторегуляторов только гексилрезорцин можно рассматривать как универсальный индуктор гипометаболического состояния штаммов, не способных к спорообразованию, в то время как гомосеринлактон индуцировал переход к этому состоянию только у мутантного штамма бацилл.

Проверка способности штаммов синтезировать AR при длительном росте на L-бульоне показала, что исследуемые штаммы в данных условиях культивирования не образуют ауторегуляторов этого типа. AR не были обнаружены ни в клетках, ни в культуральной жидкости. То есть, в отличие от *B. cereus* [Дорошенко с соавт., 2001], мутант *B. subtilis spo0E* не продуцирует AR в условиях старения. Тем не менее, результаты работы свидетельствуют, что экзогенный гексилрезорцин функционирует как сигнальная молекула, активирующая переход грамположительных бактерий в гипометаболическое состояние.

Вероятно, описанные ауторегуляторы физиологического состояния бактерий в соответствии с их функциями можно рассматривать как один из компонентов механизма стрессоустойчивости. Исследования в этой области позволят создать более полное представление об универсальном ответе микроорганизмов на стресс и сделать выводы о потенциальной возможности направленной регуляции физиологической активности патогенных бактерий. Клиническая практика нуждается в создании теоретической базы для управления процессами перехода патогенных и сапрофитных микроорганизмов в некультивируемое состояние, поскольку устойчивые формы возбудителей плохо поддаются выявлению и элиминации.

Токсические эффекты гексилрезорцина при краткосрочном культивировании бактерий на богатой питательной среде и в условиях голодания

При 18-часовом росте культур грамположительных (*B. subtilis SK1*) и грамотрицательных (*S. typhimurium TA100* и *E. coli K12*) бактерий на богатой питательной среде наибольший токсический эффект гексилрезорцина наблюдали по отношению к грамположительным бактериям (*B. subtilis SK1*) (рис. 4).

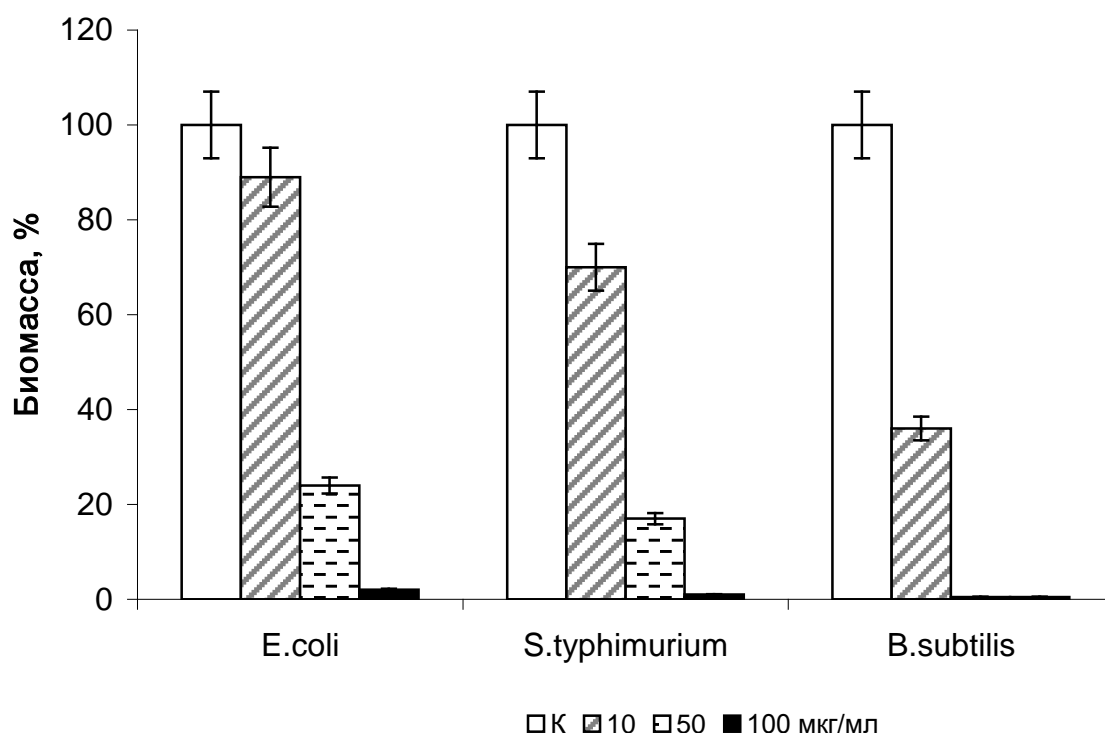


Рис. 4. Токсические эффекты гексилрезорцина по отношению к грамположительным (*B. subtilis SK1*) и грамотрицательным (*S. typhimurium TA100* и *E. coli K12*) бактериям при кратковременном (18 ч.) культивировании в богатой питательной среде (бульон Мюллера -Хинтона). За 100% принята биомасса в вариантах без гексилрезорцина.

При добавлении низкой концентрации вещества (10 мкг/мл) рост культур *S. typhimurium* TA100 и *E. coli* K12 незначительно отличался от контроля, в то время как у штамма *B. subtilis* SK1 прирост биомассы составлял менее 40% по сравнению с контролем. В концентрации 50 мкг/мл прирост биомассы у представителей грамотрицательных бактерий составлял около 20% от контроля, в то время как у *B. subtilis* SK1 прироста биомассы практически не наблюдали, как и в концентрации 100 мкг/мл (рис. 4).

При краткосрочном (18-часовом) инкубировании бактерий в дистиллированной воде в присутствии гексилрезорцина у всех трех штаммов (*S. typhimurium* TA100, *B. subtilis* SK1 и *E. coli* K12) прирост биомассы при концентрации 10 мкг/мл составил около 80% по сравнению с контролем. В двух других концентрациях (50 и 100 мкг/мл) прирост составил не более 20% от контрольного варианта без вещества (рис. 5).

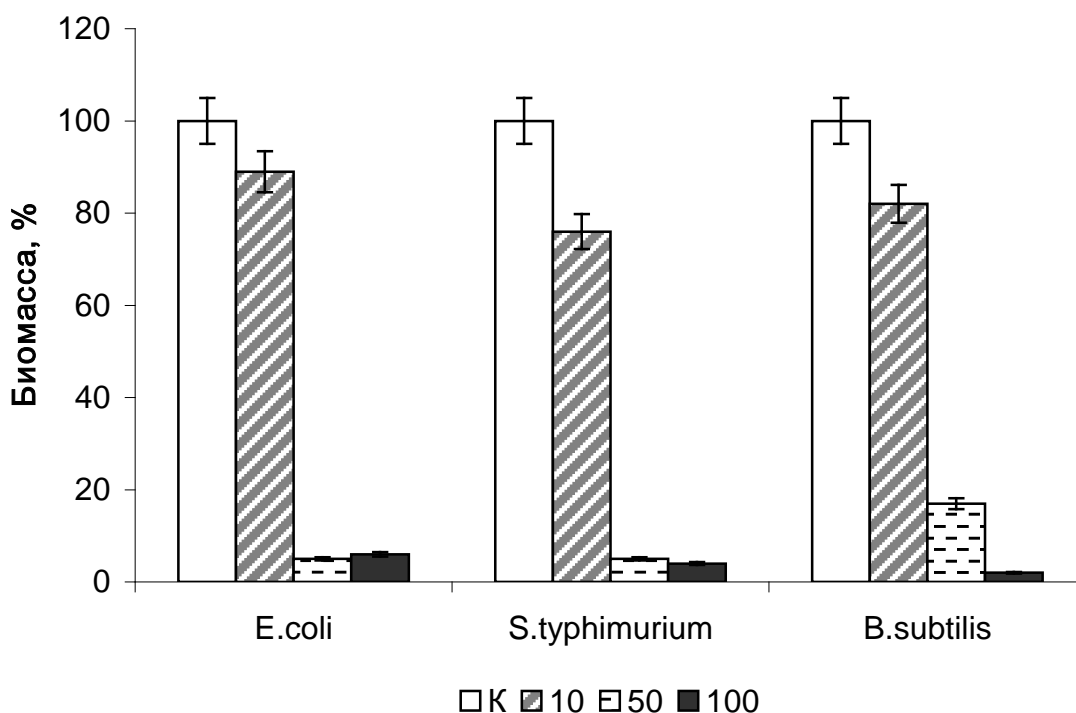


Рис. 5. Токсические эффекты гексилрезорцина по отношению к грамположительным (*B. subtilis* SK1) и грамотрицательным (*S. typhimurium* TA100 и *E. coli* K12) бактериям при кратковременном (18 ч.) инкубировании в условиях голодания (дист. вода). За 100% принята биомасса в вариантах без гексилрезорцина.

Длительность лаг-фазы в среднем составляла 10 часов, что на 5-6 ч. больше, чем при росте культур на богатой питательной среде. Соответственно, к 18-му часу инкубации в дистиллированной воде плотность клеточных суспензий была практически на порядок ниже, чем при росте на бульоне. Этот факт хорошо коррелирует с данными, подтверждающими задержку начала логарифмической фазы роста у

бактерий, растущих на средах, лимитированных по различным элементам (углероду, азоту, фосфору и т.д.) [Милько, Красильникова, 1999].

Изменение вирулентности *S. aureus* ОК под действием теплового шока в присутствии гексилрезорцина

Тепловой шок (10 мин. 60⁰С) вызывал практически полную остановку роста стафилококков. Культура после этого типа стресса, внесенная в свежую питательную среду, не давала достоверного прироста биомассы, замеренного по оптической плотности, ни в контрольном варианте, ни в вариантах с предварительной обработкой гексилрезорцином. В то же время шок при 45⁰С не являлся губительным для культуры, а в случае ее предобработки гексилрезорцином отмечено, что, начиная со второго часа культивирования после шока, оптическая плотность предобработанных культур была выше контрольной. Этот эффект проявился и при подсчете КОЕ, что определенно свидетельствует о протекторном эффекте исследуемого соединения. При этом высевалась стандартная морфологическая форма. Невзирая на минимальную прибавку оптической плотности культур, подвергшихся 60-градусному шоку, часть стафилококков сохранила способность к образованию колоний. Таким образом, в условиях «мягкого» стресса (45⁰С) стафилококк, растущий в присутствии гексилрезорцина, сохраняет превышающую контроль способность к образованию колоний, и не переходит в гипометаболические формы. «Жесткий» стресс (60⁰С) приводит к снижению в процессе роста числа КОЕ для культуры, обработанной гексилрезорцином, по сравнению с необработанной, и к значительному усилению образования гипометаболических форм.

С образованием гипометаболических форм связано, по всей видимости, и снижение общей активности гемолизина в процессе культивирования стафилококков. На рис. 6 представлены колонии *S. aureus* ОК, высеянные на кровяной агар на 7-е сутки культивирования из бульона, содержащего 100 мкМ гексилрезорцина (Б), и контрольного варианта (А) без гексилрезорцина.

Очевидно, что гексилрезорцин вызвал значительную потерю способности бактерий продуцировать гемолизины, отвечающие за вирулентность стафилококка. Необходимо отметить, что эта способность ослабевает в процессе культивирования на жидкой среде и без добавления алкилрезорцинов: у бактерий, высеянных на кровяной агар после культивирования в течение суток, гемолиз был гораздо активнее, чем у 7-суточной культуры, однако полного исчезновения зон лизиса, как при действии гексилрезорцина, не наблюдали.

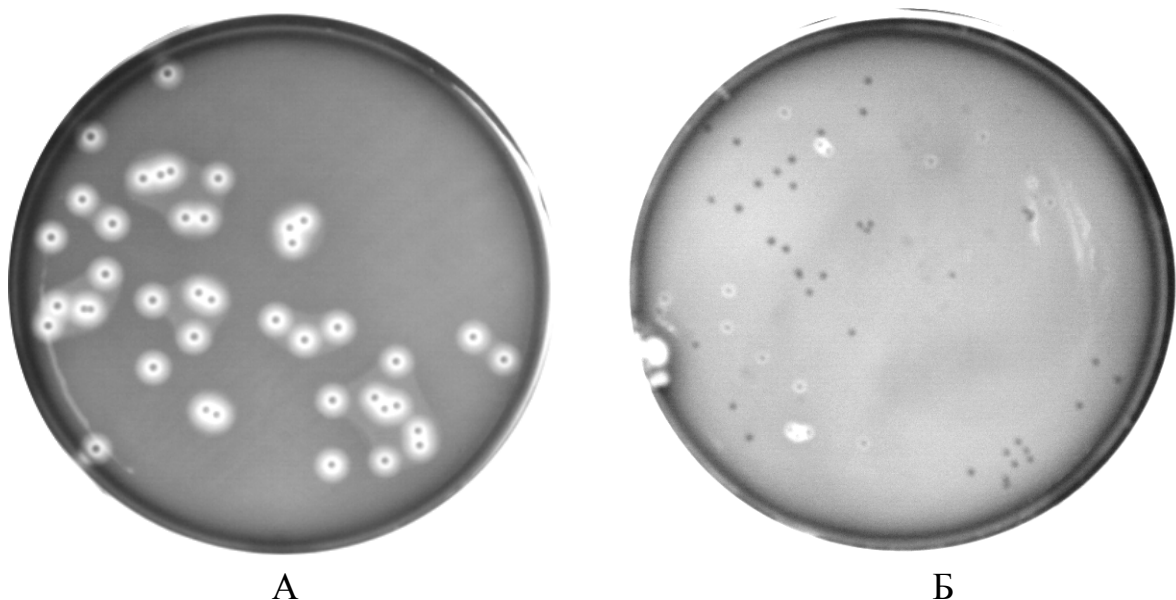


Рис. 6. Колонии *S. aureus* OK на кровяном агаре, высеянные после 7 суток культивирования на жидкой среде А – без гексилрезорцина, Б – в присутствии гексилрезорцина

На основании полученных результатов можно предположить, что гексилрезорцин по мере возрастания силы стрессовых воздействий может сначала стабилизировать нормальные функции клетки, а затем индуцировать переход стафилококков в устойчивые гипометаболические формы. Это согласуется с данными литературы о стабилизирующем и протекторном действии гексилрезорцина на клетки бактерий [Степаненко, 2005; Эль-Регистан с соавт., 2001].

Индукция образования R-форм у бактерий под действием исследуемых факторов

При концентрациях факторов 10 и 50 мкг/мл частота индукции образования колоний с нетипичными морфотипами не отличалась от спонтанной и составляла не более 0.1-0.2% от общего числа колоний во всех описанных модификациях эксперимента, различающихся по способу обработки исследуемыми ауторегуляторами.

У *S. typhimurium* TA100 было зарегистрировано 2 морфотипа колоний – доминирующие круглые мелкие гладкие матовые S-формы, типичные для нормального роста штамма, и крупные шероховатые кратерообразные R-формы желтоватого цвета. Концентрации ниже 100 мкг/мл не индуцировали образования R-форм. Добавление гексилрезорцина в суспензию оказывало больший токсический эффект, чем в случае выращивания бактерий на агаризованной среде с веществом, а часовая инкубация еще больше усиливала токсичность гексилрезорцина. При токсичных концентрациях гексилрезорцина S-формы не росли, а количество R-форм увеличивалось, что говорит об их более высокой

устойчивости к неблагоприятным условиям, в частности, к токсическим воздействиям. Для *B. subtilis SK1* было показано, что нетипичные морфотипы колоний появляются уже при добавлении гексилрезорцина в концентрации 50 мкг/мл.

Часовая инкубация способствует индукции этих форм при низкой концентрации вещества (50 мкг/мл), однако, с увеличением концентрации число колоний с нетипичными морфотипами закономерно снижается. Отмечено, что в концентрации 100 мкг/мл гексилрезорцин индуцировал образование 3-х различных морфотипов колоний (1 – мелкие гладкие колонии (типичные S-формы), 2 – крупные гладкие колонии и 3 – крупные колонии с неровными краями). С увеличением концентрации до 500 мкг/мл регистрировали образование только двух морфотипов колоний, а именно типов 1 и 2. При действии гексилрезорцина на *E. coli* диссоциации штамма на несколько морфотипов не наблюдали.

Изменение устойчивости S- и R-форм *S. typhimurium TA100* к сальмонеллезному бактериофагу

Была оценена устойчивость S- и R- форм сальмонелл, полученных под воздействием высоких концентраций гексилрезорцина и без него, к действию фага. Показано, что на чашках с S-формами, выделенными на среде в присутствии и отсутствии гексилрезорцина, через сутки инкубирования появились значительные зоны лизиса вокруг диска с фагом (радиус зоны лизиса 4 см), а рост наблюдали только по периметру чашки. R-формы же, изолированные в обоих вариантах, напротив, обладали высокой устойчивостью к фагу, и зоны лизиса вокруг диска обнаружены не были. При этом высокие концентрации гексилрезорцина не влияли на устойчивость S-форм к фагу.

Сохранение плазмиды *pkm 101* у S- и R-форм *S. typhimurium TA100* при действии гексилрезорцина

R-формы штамма *S. typhimurium TA100*, полученные при спонтанной индукции их образования, а также S- и R-формы, выращенные на среде с гексилрезорцином, подвергались пересевам на богатые питательные среды, содержащие ампициллин, в течение нескольких пассажей. При этом способность к росту на среде с антибиотиком сохранялась в течение всего времени пересевов (5 пассажей) и R→S-реверсии не наблюдали. Таким образом, переход штамма в R-форму, а также обработка гексилрезорцином не приводит к потере плазмиды устойчивости к данному антибиотику.

Особенности роста S- и R- форм *S. typhimurium* в присутствии гексилрезорцина

Гексилрезорцин в концентрации 10мкг/мл незначительно снижал рост S-форм и не влиял на R- формы. Что касается высоких концентраций,

то здесь наблюдаются более выраженные различия между диссоциантами. S-вариант ответил на присутствие гексилрезорцина в концентрации 50мкг/мл задержкой роста на 13 часов по сравнению с контролем, а при добавлении вещества в концентрации 100мкг/мл, рост в течение 18 часов зарегистрирован не был. R-диссоциант иначе реагировал на высокие концентрации гексилрезорцина: под действием концентрации 50мкг/мл задержка начала роста была значительно меньше – 3 часа по сравнению с контролем, а при добавлении аутоиндуктора анабиоза в концентрации 100мкг/мл рост зарегистрирован на 16-й час инкубации. Полученные данные подтверждают тот факт, что R-диссоцианты наряду с другими типами резистентности, обладают селективными преимуществами при действии токсических и субтоксических концентраций веществ.

В заключение мы считаем возможным обобщить полученные результаты как характеризующие исследуемые ауторегуляторы в качестве веществ, индуцирующих гипометаболическое состояние бактерий, а именно те из них, которые прямо или опосредованно влияют на геном бактериальной клетки. При этом спорообразование, как наименее глубокое состояние гипометаболизма, может быть индуцировано и без воздействия экзогенных ауторегуляторов на геном.

Вероятно, триггерное действие ауторегуляторов как индукторов гипометаболизма включает мутационные или регулирующие экспрессию генов механизмы перехода клетки от активной жизнедеятельности к стратегии выживания. Что касается иных эффектов ауторегуляторов, как то взаимодействие с липидами мембран и белками, не участвующими в репликации, поддержании структуры ДНК и регуляции экспрессии генов [Бутова с соавт., 2003; Ильинская с соавт., 2002], то в этих случаях данные ауторегуляторы не рассматриваются нами как триггерные молекулы. Это можно обосновать, исходя из стандартного определения триггера, под которым в биологии подразумевается сигнал, вызывающий метаморфоз у любых живых организмов [Bullock, 1957].

На основе анализа данных литературы и полученных экспериментальных результатов предложена схема, систематизирующая имеющиеся представления о культивируемом и некультивируемом состояниях бактерий в соответствии с их метаболическим статусом (табл.3).

Схематическое деление клеток микроорганизмов в соответствии с метаболическим состоянием

----->

Снижение жизнеспособности

Наши результаты позволили детально охарактеризовать исследуемые ауторегуляторы по способности индуцировать гипометаболическое состояние бактерий.

Генотоксичный **гексилрезорцин** способствовал переходу в гипометаболическое состояние каждой из исследованных микробных культур, что регистрировали, прежде всего, по значительно более низкому числу КОЕ по сравнению с общим числом клеток. Наличие покоящихся форм, индуцированных гексилрезорцином, было также подтверждено с помощью теста *Kogure*. Кроме того, гексилрезорцин индуцировал появление новых морфотипов колоний у *B.subtilis SK1* и *S.typhimurium TA100*, а также снижал способность к гемолизу у клеток *S.aureus*.

Метилрезорцин не проявил себя как генотоксикант и не вызывал индукции новых морфотипов, хотя индуцировал образование покоящихся форм у *B.subtilis spo0E*, что регистрировали по снижению числа КОЕ.

Пара-2-гидроксиэтилфенол не проявил себя как генотоксикант, и в незначительной степени индуцировал образование покоящихся форм у *B.subtilis spo0E*, по сравнению с остальными регуляторами, а также ускорял индукцию спорообразования этого штамма. Новых морфотипов не высевалось.

Гомосеринлактон - единственный ауторегулятор из исследованных, который обладает специфическим действием на макромолекулы микробной клетки, а именно на белки – факторы транскрипции, регулирующие экспрессию генов. Он не является токсикантом или генотоксикантом, не индуцирует морфогенез у бактерий, однако значительно сильнее способствует переходу *B.subtilis spo0E* в гипометаболическое состояние, чем другие исследованные факторы. Кроме того, как и пара-2-гидроксиэтилфенол, он несколько ускорял индукцию спорообразования у дефектного по спорообразованию штамма бацилл.

Это означает, что из всех изученных нами микробных ауторегуляторов только гексилрезорцин можно назвать универсальным фактором перевода бактерий в состояние гипометаболизма, поскольку он способствовал образованию покоящихся форм у каждой из исследованных нами микробных культур. Именно гексилрезорцин проявил себя как истинный генотоксикант, причем по отношению как к про-, так и к эукариотам. Можно предположить, что неспецифический перевод микробных клеток в состояние покоя связан с воздействием индуктора гипометаболизма на геном и его непосредственным взаимодействием с ДНК бактерий.

Таким образом, генотоксичные ауторегуляторы роста, а именно гексилрезорцин, можно рассматривать как триггерные молекулы,

запускающие процессы морфогенеза и образования устойчивых форм микроорганизмов после первичного повреждения ДНК. Что касается гомосеринлактона, который вызывал индукцию гипометаболизма у штамма бацилл с нарушенным спорообразованием, то, вероятно, механизм его действия связан с изменением экспрессии не только известных генов, подверженных регуляции по типу *luxI-luxR* оперона, как то система *luxI-luxR* (биолюминесценция), *lasI-lasR* (синтез внеклеточных гидролитических ферментов (пектиназ, целлюлаз и др.), система *vsmI-vsmR*, или *rhlI-rhlR* (синтез факторов вирулентности) [Mamson *et al.*, 1998; Revenchon *et al.*, 1998; Losick, Kaiser, 1997], но и генов, ответственных за процессы споруляции.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что токсичность микробных ауторегуляторов по отношению к бактериям возрастает в ряду «пара-2-гидроксиэтилфенол – гомосеринлактон – метилрезорцин – резорцин – гексилрезорцин».
2. Среди исследованных ауторегуляторов только гексилрезорцин является истинным генотоксикантом, проявляющим мутагенность в нетоксичных концентрациях, вызывающим прямое ДНК-повреждающее действие и индукцию синтеза ДНК на поврежденной матрице (SOS-ответ) у бактерий. Гексилрезорцин индуцирует мутации в геноме эукариот.
3. Экзогенный гексилрезорцин, в отличие от метилрезорцина, пара-2-гидроксиэтилфенола и гомосеринлактона, способствует переходу бактерий (*S. aureus* OK, *B. subtilis* *spo0E*, *B. subtilis* SK1, *E. coli* K12) в гипометаболическое состояние за счет неспецифических взаимодействий с макромолекулами микробной клетки. Гомосеринлактон способствует переходу в гипометаболическое состояние дефектных по спорообразованию бактерий (*B. subtilis* *spo0E*) и, как и пара-2-гидроксиэтилфенол, ускоряет индукцию их спорообразования.
4. Гексилрезорцин индуцирует морфогенез штаммов *B. subtilis* SK1, *S. typhimurium* TA 100, но не *E. coli* K12, в то время как гомосеринлактон не приводит к индукции морфогенеза бактерий.
5. Гексилрезорцин индуцирует потерю вирулентности *S. aureus* OK. У *S. typhimurium* TA 100 обработка гексилрезорцином не вызывает потери плазмиды *pkm* 101, не изменяет фагоустойчивости S- и R- форм и не влияет на их антигенные детерминанты.
6. Предложена схема, отражающая механизм индукции гипометаболического состояния бактерий путем взаимодействия с макромолекулами клетки, включая ДНК.

*Автор благодарит зав. каф. микробиологии КГУ проф. Ильинскую О.Н. за осуществление научного руководства; проф. Куриненко Б.М. и сотрудников НИЛ ИЭН, а также зав. лаб. НИЛ ББФ с.н.с. Колпакова А.И. за участие в обсуждении результатов; зав. лаб. микробиологии РЦПБ СПИД Шахбазову Е.Н. и с.н.с. ЛБИ ИОФХ им. А.Е. Арбузова Зобова В.В. за возможность проведения ряда экспериментов на базе лабораторий; проф. ИНМИ РАН (г. Москва) Эль-Регистан Г.И. за предоставление регуляторных факторов и обсуждение материалов работы; зав.каф. микробиологии КГМА проф. Поздеева О.К. за предоставление клинического изолята *Staphylococcus aureus*; н.с. СЭС г.Казани Григорьеву И.А. за предоставление бактериофага и антисывороток.*

Работы, опубликованные по теме диссертации

1. **Маргулис А.Б.** Выживаемость патогенных и условно патогенных бактерий при действии индукторов анабиоза / **А.Б.Маргулис**, О.Н.Ильинская // IV научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Республики Татарстан. Тезисы докладов. Естественнонаучное направление, секция Медико-биологические проблемы.–Казань.- 11-12 декабря 2001 г. -С. 37.
2. **Маргулис А.Б.** Роль микробных ауторегуляторов группы d1 в SOS-индуцируемом мутагенезе / **А.Б.Маргулис**, О.Н.Ильинская // Республиканский конкурс научных работ среди студентов и аспирантов на соискание премии им. Н.И. Лобачевского. Сборник тезисов итоговой конференции. -Том II.–Казань. -2002. -С. 4-5.
3. **Маргулис А.Б.** Изменение активности ферментов гемолитического комплекса стафилококков в условиях стресса / **А.Б.Маргулис**, О.Н.Ильинская, А.И.Колпаков // Тез. докладов III Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов НОЦ КГУ «Материалы и технологии XXI века».- Казань.- 14-15 февраля 2003. -С.56.
4. **Маргулис А.Б.** Гексилрезорцин ускоряет образование гипометаболических форм бактерий в условиях голодания / **А.Б.Маргулис**, О.Н.Ильинская, А.И.Колпаков, Г.И.Эль-Регистан // Труды Объединенной международной научной конференции «Новая геометрия природы».- Казань.- Август 25 – сентябрь 5, 2003.- Т.2.- (Биология. Медицина). –С.219-225.
5. **Маргулис А.Б.** Роль микробных ауторегуляторов группы алкилоксибензолов в образовании гипометаболических форм бактерий / **А.Б.Маргулис**, О.Н.Ильинская, А.И.Колпаков // Тезисы докладов 7-й Пущинской конференции молодых ученых «Биология-наука 21-го века». – Пущино.- 2003. –С.283-284.
6. **Маргулис А.Б.** Индукция SOS-ответа клетки под действием ауторегуляторных факторов микроорганизмов/ **А.Б.Маргулис**, О.Н.Ильинская, А.И.Колпаков, Г.И.Эль-Регистан // Генетика. -2003.-Т.39.- №9. –С.1180-1184.
7. Бушманова О.В. Оценка генотоксических свойств гомосеринлактона/ О.В.Бушманова, И.В.Ожиганова, **А.Б.Маргулис** // XI Туполевские чтения. Всероссийская (с международным участием) молодежная научная конференция. –Тезисы докладов. -8-10 октября, 2003 г. –Т.1. –С.154.
8. Ilinskaya Olga. Cytotoxic and genotoxic effects of the β -(triphenylphosphonio)ethyl carboxylate and of the N,N'-bis(dihexylphosphinomethyl)-1,4-diaminocyclohexane / Olga Ilinskaya, Pavel Zelenikhin, Alexey Kolpakov, Nazira Karamova, **Anna Margulis** // Medical Science Monitor. -2004.- Vol.10.- N8.- P. 294-299.
9. **Маргулис А.Б.** Влияние гексилрезорцина на неспорообразующие грамположительные бактерии / **А.Б.Маргулис**, О.Н.Ильинская // Сборник

тезисов 8-й Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых “БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА”. -17-21 мая 2004 г. –С.154.

10. **Маргулис А.Б.** Адаптивный ответ стафилококков на действие микробных факторов индукции анабиоза / **А.Б.Маргулис**, О.В.Бушманова, И.В.Ожиганова, А.И.Колпаков, О.Н.Ильинская // Вестник ТО РЭА. – Казань. -№ 1. -2004. –С. 41-44.

11. Ожиганова И.В. Влияние бактериального индуктора анабиоза – гексилрезорцина – на геном эукариотической клетки / И.В.Ожиганова, О.В.Бушманова, **А.Б.Маргулис**, А.И.Колпаков // Материалы Научной конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». –Казань. –17-18 июня, 2004г. –С.65-66.

12. Ильинская О.Н. Краткосрочные тест-системы для определения генотоксичности / О.Н.Ильинская, **А.Б.Маргулис** // Методическое руководство. -Казань: изд-во КГУ. -2005. -31с.

13. Бушманова О.В. Изменение биосинтеза и активности протеаз бактерий под действием гомосеринлактона / О.В.Бушманова, И.В.Ожиганова, **А.Б.Маргулис**, А.И.Колпаков, О.Н.Ильинская // Материалы XIII Международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение».- Казань.- 4-8 апреля 2005 г.- С.15-16.

14. Ожиганова И.В. Участие гомосеринлактона и гексилрезорцина в адаптивных реакциях микроорганизмов / И.В.Ожиганова, О.В.Бушманова, **А.Б.Маргулис**, А.И.Колпаков // Сборник тезисов 79-й Всероссийской студенческой конференции, посвященной 1000-летию Казани.- КГМУ.- 12-14 апреля 2005 г.- С.102.

15. **Маргулис А.Б.** Индукция гипометаболического состояния у мутантного штамма *Bacillus subtilis spo0E* / **А.Б.Маргулис**, А.И.Колпаков, О.Н.Ильинская // Сборник тезисов 9-й Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых “БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА”. -18-22 апреля 2005 г. –С.202.

16. **Маргулис А.Б.** Гексилрезорцин как индуктор микроядер в полихроматофильных эритроцитах периферической крови мышей / **А.Б.Маргулис**, И.В.Ожиганова, О.В.Бушманова, А.И.Колпаков, О.Н.Ильинская // Генетика.- 2005.- Т.41.- №8.- С.1045-1048.

17. **Margulis A.B.** Involvement of homoserinelactone and hexylresorcinol in adaptive reactions of microorganisms / **А.Б.Мargulis**, А.И.Kolpakov, О.Н.Ilinskaya // Abstracts of the VI-nd International Conference Environmental pollution // Perm.- 20-25 September, 2005.- P.193.

18. **Маргулис А.Б.** Индукция гипометаболических форм у неспорообразующих грамположительных бактерий / **А.Б.Маргулис**, О.Н.Ильинская, А.И.Колпаков, К.Муфер // Ученые записки Казанского государственного университета.- Т.147.- Серия Естественные науки.- Кн.2.- 2005.-С.108-114.